

# 2023 年度青岛市科学技术奖提名公示

## 一、项目名称

耐冬山茶生长发育调控分子机理研究

## 二、提名单位（专家）及提名意见、提名等级（不超过 600 字符）

青岛农业大学为本项目第一提名单位

我单位认真审阅了该项目推荐书及其附件材料，确认真实有效，相关栏目符合填写要求。

按照要求，我单位及完成人所在单位均进行了公示，确认完成人、完成单位排序无异议。

该成果针对中国分布最北缘的山茶属植物常绿植物—耐冬山茶面临濒危的突出问题，系统开展了耐冬山茶抗逆调控机制研究、重瓣花和果实发育调控机制、组培快繁技术和山茶抗寒育种工作。构建了第一个耐冬山茶低温转录组、第一个耐冬山茶干旱转录组，阐明了耐冬山茶的耐寒和耐寒调控分子机制。首次在山茶中获得 MADS-box 家族花器官发育调控基因，并进行了重瓣花发育调控研究。成功组装了全球首个染色体级别高质量油茶基因组，实现了山茶类植物从传统育种向基因组育种的跨越，为提高山茶良种的选育效率和保障我国粮油安全奠定了重要基础。探讨了农杆菌介导的耐冬山茶遗传转化体系，获得了耐冬山茶遗传转化的最佳因素组合。项目实施中编制了耐冬山茶组培快繁技术规程，建立了耐冬山茶示范基地，为生产提供技术指导。耐寒山茶的推广应用，可节省南方山茶的冬季保护设备费用和引种驯化费用，丰富青岛地区冬季露地越冬观赏植物的种类。对于青岛地区的园林景观效果和生态效益，也将起到极大的提升作用。总体上，

本研究技术先进，研究内容地域性特色明显，针对性强，创新点突出，社会效益、经济效益和生态效益提升显著。

参照青岛市科学技术奖推荐条件，推荐该项目申报 2023 年度青岛市自然科学奖二等奖。

### 三、项目简介

本成果针对中国分布最北缘（青岛崂山，中国）的山茶属植物常绿植物—耐冬山茶面临濒危的突出问题，系统开展了耐冬山茶耐寒调控机制研究、耐冬山茶的功能性状对环境变化的响应机制、组培快繁技术和山茶抗寒育种工作。以青岛市市花、濒危的耐冬山茶为研究对象，通过全长转录组分析，对耐冬山茶响应低温胁迫的关键通路与基因进行解析；通过遗传转化，获得转耐寒基因南方山茶愈伤。基于耐冬山茶功能性状揭示了该植物在不同逆境条件下的生理生态学响应，揭示野生耐冬山茶的功能性状对环境变化的响应机制。获得了耐冬山茶遗传转化的最佳因素组合；编制了耐冬山茶组培快繁技术标准，建立了耐冬山茶示范基地，为耐冬山茶、耐寒南方山茶的推广应用提供技术指导，并推动青岛市山茶产业发展。具体成果如下：

#### （1）阐明了耐冬山茶的抗逆性调控机制

①构建了第一个耐冬山茶低温全长转录组，并鉴定出 4544 个显著差异表达基因。从耐冬山茶中分离到抗寒基因有 *CjCor1*、*CjICE1*、*CjSPMS*、*CjRAV*、*CjCBFs* 等 8 个基因。对这 8 些抗寒基因进行了生物信息学分析、荧光定量表达分析以及转拟南芥功能验证，确定其抗寒调控功能。酵母双杂交试验分析了基因之间的相互作用关系。

②成功构建上述 8 个基因的植物表达载体，同时将 *CjCor1*、

*CjICE1*、*CjSPMS*、*CjRAV* 耐寒基因转入南方山茶，得到转基因愈伤，用以培育耐寒植株。将 *CjAPL1*、*CjAPL2*、*CjAGL6*、*CjAG1* 4 个基因转入耐冬山茶中，分别获得重瓣耐冬山茶品种植物愈伤组织。

③构建了第一个耐冬山茶干旱转录组，并鉴定出 265 个差异基因和 3383 个 lncRNA。瞬态表达实验表明，在干旱胁迫下山茶叶片过表达 *CjGST1* 显著增加了叶面积，具有更高的抗旱性，为揭示干旱胁迫的分子机制提供了新的思路。

## **（2）揭示山茶重瓣花形成和果实发育调控机制**

①首次在山茶中获得 MADS-box 家族花器官发育调控基因 *CjAPL1*、*CjAPL2*、*CjAGL6* 和 *CjAG1*，时空表达模式和模式植物功能基因验证结果表明这 4 个基因在山茶重瓣花形成过程中具有花器官属性决定及花器官数量增加的调控功能。

②成功组装了全球首个染色体级别高质量油茶基因组，揭示了油茶物种进化历史及其种子高油脂、高不饱和脂肪酸含量的驯化机制，建立了油脂性状早期选择技术体系。油茶基因组的破译，实现了油茶从传统育种向基因组育种的跨越，为提高山茶良种的选育效率、山茶发育分子研究和保障我国粮油安全奠定了重要基础。

## **（3）制定了耐冬山茶组培快繁技术标准**

以耐冬山茶子叶为外植体，通过愈伤组织途径，建立了耐冬山茶组培快繁体系。探讨了不同因素对子叶愈伤组织诱导及植株再生的影响。耐冬山茶子叶愈伤组织增殖的较优激素配比为 0.5 mg/L NAA+1.5mg/L 6-BA。

#### **(4) 获得了耐冬山茶遗传转化体系的最佳因素组合**

确定了耐冬山茶在以农杆菌 GV3101 为介导的遗传转化过程中抑菌剂头孢霉素的合适浓度为 100 mg/L，选择剂潮霉素 B 的合适浓度为 150-200 mg/L。

本项目发表相关 SCI 论文 10 篇以上，一级学报 2 篇，核心期刊论文 2 篇；制定耐冬山茶组培快繁技术标准 1 个，授权国际发明专利 3 项，申请国内发明专利 1 项；培养研究生 8 名。

#### **四、客观评价**

**创新性方面**，本成果具有以下重大创新性发现：

(1) 首次进行了市花耐冬山茶的低温转录组和耐旱转录组的测序工作，并挖掘了耐冬山茶耐寒和耐旱调控的重要代谢途径和调控基因，揭示了耐冬山茶的耐寒机制。对耐冬山茶 RNA 提取工艺进行了创新，为山茶属植物的 RNA 高质量提取提供技术支持。对耐冬山茶的再生条件进行了优化，并首次筛选出适用于农杆菌介导的耐冬山茶遗传转化中抗生素的浓度。

(2) 成功组装了全球首个染色体级别高质量油茶基因组，揭示了油茶物种进化历史及其种子高油脂、高不饱和脂肪酸含量的驯化机制，实现了油茶从传统育种向基因组育种的跨越，为提高山茶良种的选育效率、山茶发育分子研究和保障我国粮油安全奠定了重要基础。

**效益方面**，耐寒山茶品种投放社会使用后，可以节省南方山茶的冬季保护设备（棚架、盖物等）费用和种苗费。耐冬山茶试验基地每月可滞尘 175kg。耐寒山茶的使用，可丰富青岛地区冬季露地越冬观

赏植物的种类；重瓣耐冬山茶的使用，可增强耐冬山茶的观赏价值。

对于青岛地区的园林景观效果，也将起到极大的提升作用。

五、推广应用情况

本成果在理论研究的基础上，进行了社会应用推广。已在青岛高科技工业园东都实业有限公司和青岛植物园两个地方分别建立耐冬山茶示范基地，共计 35 亩；根据制定的耐冬山茶组培规程进行耐冬山茶快繁，可以年产 3 万株小苗。

六、主要知识产权和标准规范等目录

| 知识产权<br>(标准)类别 | 知识产权(标准)具体名称                                                                                      | 国家<br>(地区) | 授权号(标准编号)            | 授权<br>(标准发布)日期    | 证书编号<br>(标准批准发布部门) | 权利人<br>(标准起草单位) | 发明人(标准起草人)                      | 发明专利<br>(标准)有效状态 |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|----------------------|-------------------|--------------------|-----------------|---------------------------------|------------------|
| 国际专利           | Method for measuring absorption and retention effects of plants on particles with different sizes | 南非         | 2021/07057           | 2021/10/27        | 2021/07057         | 青岛农业大学          | 李海梅, 周春玲, 孙迎坤, 郭霄, 徐萌, 朱旭       | 有效               |
| 国际专利           | Method for Simulating Atmospheric Natural Dustfall                                                | 南非         | 2022/01146           | 2022/03/17        | 2022/01146         | 青岛农业大学          | 李海梅, 田园, 朱旭, 孙丽, 孙迎坤, 梁红, 李士美   | 有效               |
| 国际专利           | Method for Simulating Atmospheric Natural Dustfall                                                | 南非         | 2021/07197           | 2021/10/28        | 2021/07197         | 青岛农业大学          | 李海梅, 李彦华, 李士美, 梁红, 李伟, 徐丽娜, 卢婉佩 | 有效               |
| 国内专利           | 一种耐冬山茶叶片总 RNA 提取方法                                                                                | 中国         | 202010582864.4 (申请号) | 2020.06.23 (申请日期) | 无                  | 青岛农业大学          | 孙迎坤, 范梦龙, 解丰羽                   | 无                |
| 标准             | 耐冬山茶组培快繁技术标准                                                                                      | 中国         | 无                    | 无                 | 无                  | 青岛农业大学          | 孙迎坤, 田红梅                        | 无                |

|                |                                                                                                                                           |    |                                       |            |                                   |              |                                                                                                                                                                                                                       |     |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|---------------------------------------|------------|-----------------------------------|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| SCI 论文<br>(二区) | Temporal transcriptome profiling reveals candidate genes involved in cold acclimation of <i>Camellia japonica</i> (Naidong)               | 国际 | DOI:<br>10.1016/j.plaphy.2021.09.006  | 2021.09.11 | Plant Physiology and Biochemistry | 青岛农业大学       | Fan MengLong, Yang Kai, Zhou Rui, Liu QingHua, Guo Xiao, <b>Sun YingKun (孙迎坤) *</b>                                                                                                                                   | 已发表 |
| SCI 论文<br>(三区) | CBF transcription factors involved in the cold response of <i>Camellia japonica</i> (Naidong)                                             | 国际 | DOI:<br>10.7717/peerj.12155           | 2021.09.09 | Peer J                            | 青岛农业大学       | Fan Menglong, Zhou Rui, Liu Qinghua, <b>Sun YingKun (孙迎坤) *</b>                                                                                                                                                       | 已发表 |
| SCI 论文<br>(一区) | The genome of oil-Camellia and population genomics analysis provide insights into seed oil domestication                                  | 国际 | DOI:10.1186/s13059-021-02599-2        | 2022.01    | Genome Biology                    | 中国林业科学研究院亚林所 | Lin Ping, Wang Kailiang, Wang Yupeng, Hu Zhikang, Yan Chao, Huang Hu, Ma Xianjin, Cao Yongqing, Long Wei, Liu Weixin, Li Xinlei, Fan Zhengqi, Li Jiyuan, Ye Ning, Ren Huadong, Yao Xiaohua, <b>Yin Hengfu (殷恒福) *</b> | 已发表 |
| SCI 论文<br>(二区) | Identification of Alternatively Spliced Gene Isoforms and Novel Noncoding RNAs by Single-Molecule Long-Read Sequencing in <i>Camellia</i> | 国际 | DOI:<br>10.1080/15476286.2020.1738703 | 2020.07    | RNA Biology                       | 中国林业科学研究院亚林所 | Hu Zhikang, Lyu Tao, Yan Chao, Wang Yupeng, Ye Ning, Fan Zhengqi, Li Xinlei, Li Jiyuan, <b>Yin Hengfu (殷恒福) *</b>                                                                                                     | 已发表 |
| SCI 论文<br>(一区) | CjPLE, a PLENA-like gene, is a potential regulator of fruit development via activating the FRUITFUL homolog in <i>Camellia</i>            | 国际 | DOI:<br>10.1093/jxb/erz142            | 2019, 06   | Journal of Experimental Botany    | 中国林业科学研究院亚林所 | Lyu Tao, Fan Zhengqi, Yang Wen, Yan Chao, Hu Zhikang, Li Xinlei, Li Jiyuan, <b>Yin Hengfu (殷恒福) *</b>                                                                                                                 | 已发表 |
| SCI 论文<br>(一区) | Phylogenetic tree-informed microRNAome analysis uncovers conserved and                                                                    | 国际 | DOI:<br>10.1093/jxb/erw095            | 2016, 04   | Journal of Experimental Botany    | 中国林业科学研究院亚林所 | <b>Yin Hengfu (殷恒福) *</b> , Fan Zhengqi, Li Xinlei, Wang Jiangying, Liu Weixin, Wu Bin, Ying Zhen,                                                                                                                    | 已发表 |

|                |                                                                                                                                |    |                                   |            |                   |                      |                                                                                                      |     |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-----------------------------------|------------|-------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|                | lineage-specific miRNAs in <i>Camellia</i> during floral organ development                                                     |    |                                   |            |                   |                      | Liu Liping, Liu Zhongchi, Li Jiyuan                                                                  |     |
| SCI 论文<br>(二区) | Distinct double flower varieties in <i>Camellia japonica</i> exhibit both expansion and contraction of C-class gene expression | 国际 | DOI:<br>10.1186/s12870-014-0288-1 | 2014.10    | BMC Plant Biology | 青岛农业大学, 中国林业科学研究院亚林所 | <b>Sun Yingkun (孙迎坤)</b> , Fan Zhengqi, Li Xinlei, Liu Zhongchi, Li Jiyuan, <b>Yin Hengfu (殷恒福)*</b> | 已发表 |
| 核心论文           | 耐冬山茶子叶再生体系的研究                                                                                                                  | 中国 | ISSN :<br>1673-5102               | 2021.03.16 | 植物研究              | 青岛农业大学               | 田红梅, 郭霄, 王奎玲, <b>孙迎坤*</b>                                                                            | 已发表 |
| 核心论文           | 耐冬山茶抗寒基因 CjCor1 的全长克隆与表达分析.                                                                                                    | 中国 | 无                                 | 2016.09    | 植物研究              | 南京林业大学, 青岛农业大学       | <b>杨凯, 孙迎坤</b> , 王奎玲, 刘庆华, 高捍东*                                                                      | 已发表 |

## 七、主要完成人情况

1. 孙迎坤, 教授, 青岛农业大学, 完成了耐冬山茶“3+2”转录组数据分析, 构建了第一个山茶低温全长转录组和耐旱转录组。分离了 *CjICE1*、*CjCBF1*、*CjCBF2*、*CjCBF5* 等 4 个抗寒基因和 *CjGST1* 耐旱基因, 酵母双杂交试验分析了基因之间的相互作用关系, 揭示了耐冬山茶耐寒和耐寒调控机理。制定了耐冬山茶组培快繁技术标准 1 个, 申报相关专利 1 项。对推荐书《主要科技创新》中所列第 1-7 项发现都做出了创造性贡献。

2. 殷恒福, 研究员, 中国林业科学研究院亚林所, 在全球破译了油茶基因组, 揭示了山茶类物种进化历史及其种子高油脂、高不饱和和脂肪酸含量的驯化机制, 建立了油脂性状早期选择技术体系, 实现了油茶从传统育种向基因组育种的跨越。与孙迎坤一起在山茶中获得 MADS-box 家族花器官发育调控基因, 对山茶重瓣花形成过程进行了分子机理剖析。对推荐书《主要科技创新》中所列第 1、2、3 项发现

都做出了创造性贡献。

3. 李海梅，教授，青岛农业大学，完成了耐冬山茶耐寒生理指标测定、转基因拟南芥生理生态指标的测定和数据的整理分析工作，对山茶种植地的生态效益特别是滞尘效益进行了深入分析。对推荐书《主要科技创新》中所列第 2 和 3 项发现都做出了创造性贡献。

4. 杨凯，讲师，青岛农业大学，从耐冬山茶中分离了 *CjCor1*、*CjSPMS*、*CjCBF3*、*CjRAV* 等 4 个基因，验证了关键基因的耐寒性功能。对推荐书《主要科技创新》中所列第 1-2 项发现都做出了创造性贡献。

八、主要完成单位及创新推广贡献

|                                                                                                                                                                                                                                                      |        |    |   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|----|---|
| 单位名称                                                                                                                                                                                                                                                 | 青岛农业大学 | 排名 | 1 |
| 对本项目应用推广情况的贡献：<br><br>青岛农业大学是本项目的第一完成单位。主要在以下方面取得创新性成果：系统研究了完成了耐冬山茶“3+2”转录组数据分析，构建了第一个山茶低温全长转录组和第一个耐旱全长转录组。分离了 8 个抗寒基因和 1 个耐旱关键基因，首次揭示了耐冬山茶耐寒和耐旱调控机理。制定了耐冬山茶组培快繁技术标准 1 个，授权国际发明专利 3 项，申请国内发明专利 1 项；发表相关 SCI 论文 10 篇以上，一级学报 2 篇，核心期刊论文 2 篇，培养研究生 8 名。 |        |    |   |

|      |              |    |   |
|------|--------------|----|---|
| 单位名称 | 中国林业科学研究院亚林所 | 排名 | 2 |
|------|--------------|----|---|

对本项目应用推广情况的贡献：

中国林业科学研究院亚林所是本项目第二完成单位，主要在以下方面取得创新性成果：在全球破译了油茶基因组，揭示了山茶类物种进化历史及其种子高油脂、高不饱和脂肪酸含量的驯化机制，建立了油脂性状早期选择技术体系，实现了油茶从传统育种向基因组育种的跨越。与青岛农业大学一起在首次在山茶中获得 MADS-box 家族花器官发育调控基因，对山茶重瓣花形成过程进行了分子机理剖析。

## 九、完成人合作关系说明

在山茶种质资源创新方面，长期进行研究生培养、项目申报、论文发表等科研工作的合作。